



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 46 366 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
A 01 N 43/38

②① Aktenzeichen: 197 46 366.5
②② Anmeldetag: 21. 10. 97
④③ Offenlegungstag: 6. 5. 99

DE 197 46 366 A 1

⑦① Anmelder:
Temmen GmbH, 65795 Hattersheim, DE

⑦④ Vertreter:
Temmen, K., Dr., 65795 Hattersheim

⑦② Erfinder:
Temmen, Karl-Heinz, Dr., 65795 Hattersheim, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Pflanzenstärkungsmittel auf der Basis von Zellstreckungshormonen Zur Bekämpfung von biotrophen Schadorganismen

⑤⑦ Durch eine Aktivierung von Abwehrmechanismen in der Pflanze kann der Befall von Schaderregern vermindert werden, ohne diese, wie Pflanzenschutzmittel, direkt zu beeinflussen.

In Versuchen wurde gefunden, daß mit Hilfe von Zellstreckungshormonen, vorrangig aus der Gruppe der Auxine, zu denen die Indolyllessigsäure (IES), Tryptophan sowie die synthetischen Stoffe wie Naphthalin, substituierte Phenolverbindungen und Benzoesäuren gehören, das Zellstreckungswachstum von Pflanzenzellen gezielt beschleunigt werden kann. Durch Zellstreckungshormone werden die Zellen volumenmäßig vergrößert und der Gehalt des Cytoplasmas proportional zum Zellwachstum stark vermindert. Die Volumenzunahme der Zelle wird durch Aufnahme von Wasser unter Ausbildung und starker Vergrößerung der Vakuolen hervorgerufen, wobei sich das Cytoplasma an den Zellwänden ablagert. Obwohl die Aufgaben des Cytoplasmas in einer obligaten Wirt-Parasit-Beziehung noch wenig erforscht sind, ist bekannt, daß biotrophe Organismen als Lebensgrundlage auf Cytoplasma angewiesen sind. Erstmals wurde an Ribes festgestellt, daß in unterschiedlich anfälligen Sorten mit zunehmender Vakuolisierung der Epidermiszellen der Befall durch den echten Mehltau proportional abnimmt. Für die Ausbildung eines Primärhaustoriums ist eine "Starterzelle" erforderlich, das sind Zellen reich an Cytoplasma. Nach erfolgter Primärinfektion ist das Wachstum des Pilzes bis zur Sporulation ebenfalls von einem niedrigen Vakuolisierungsgrad der übrigen ...

DE 197 46 366 A 1

Im Zuge des wachsenden Umweltbewußtseins stellt die Steigerung der Resistenz von Kulturpflanzen gegenüber phytopathogenen Schaderregern eine Alternative zum Einsatz von chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln dar. Durch eine Aktivierung von Abwehrmechanismen in der Pflanze kann der Befall von Schaderregern vermindert werden, ohne diese, wie Pflanzenschutzmittel, direkt zu beeinflussen.

Es liegen eine große Anzahl von Untersuchungen vor, in denen durch sogenannte Resistenzinduktoren, wie z. B. Extrakte aus *Reynoutria sachalinensis* (Stauden-Knöterich), B 50 (Kulturfiltrat von *Bacillus subtilis*) Trigonellin (N-Methylnikotinsäure), INA (Dichlornikotinsäure) sowie ORY (Oryzemat) u. a. eine Befallsverminderung erreicht wurde. Die Ergebnisse waren jedoch aufgrund des fließenden ontogenetischen Entwicklungszustandes der Pflanze häufig schwer reproduzierbar. Die Ursache sowie der dabei wirksame Resistenzmechanismus konnten bislang nicht geklärt werden. Kraska faßte alle beobachteten Wirkungsmechanismen zu nachfolgenden Gruppen zusammengefaßt. 1. Strukturelle Veränderungen in der Wirtspflanze 2. Produktion antifungal Substanzen 3. Synthese und gesteigerte Aktivität von Proteinen 4. Veränderungen in den Source-Sink-Beziehungen und der Ernährung (Kraska, T, 1996: Vergleichende Untersuchungen von Resistenzinduktoren, deren Wirkungsweise und dem Einfluß auf die DNA-Methylierung. Diss. Universität Hannover, 143 S.).

Gegenstand der Erfindung sind Produkte auf der Basis von Zellstreckungshormonen, vorrangig aus der Gruppe der Auxine, welche das Streckungswachstum von Zellen beschleunigen (escape), die Zellen volumenmäßig vergrößern und den Gehalt des Cytoplasmas proportional zum Zellwachstum stark vermindern. Die Volumenzunahme der Zelle wird durch Aufnahme von Wasser unter Ausbildung und starker Vergrößerung der Vakuolen hervorgerufen, wobei sich das Cytoplasma an den Zellwänden ablagert. Der eigentliche Angriffspunkt der Zellstreckungshormone liegt im Stoffwechsel des Cytoplasmas begründet. Durch die teilweise nach Art tierischer Hormone erfolgender Fernleitung und Fernwirkung, können die Wachstumsprozesse der Zellen durch geringe Mengen eines Hormones gesteuert werden. Obwohl die eigentliche Aufgabe des Cytoplasmas sowie die Bedeutung in einer obligaten Wirt-Parasit-Beziehung wenig erforscht sind, ist bekannt, daß hier nicht nur artspezifische Synthesen der verschiedenen Bausteine, wie Kohlenhydrate, Aminosäuren und Polypeptide, N-Basen und Nukleotide, Lipide u. a. m. erfolgen, sondern es müssen auch alle diese Stoffe in artspezifischer Weise zusammengefügt werden zu den strukturellen Elementen des Cytoplasmas.

Zu den wichtigsten Zellstreckungshormonen aus der Gruppe der Auxine zählt die Indolylessigsäure (IES), welche strukturelle Beziehungen zu der Aminosäure Tryptophan besitzt. Neben Verwandten der β -Indolylessigsäure (z. B. β -Indolylbuttersäure) sind vor allem Naphthalin-Verbindungen (z. B. α -Naphthyllessigsäure, β -Naphthoxyessigsäure, Acenaphthenessigsäure) und substituierte Phenolverbindungen, wie 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4D) oder substituierte Benzoesäuren zu nennen.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Erkennen der Wechselbeziehungen zwischen Wirt und Parasit sowie die Begründung für das Resistenzverhalten von Pflanzen, die mit Zellstreckungshormonen behandelt wurden. Obligate Parasiten wie Pilze, Bakterien und Viren sind auf Cytoplasma als Lebensmedium angewiesen. So können z. B. die Viren der Mosaikkrankheit des Tabaks sich ausschließlich im lebenden Plasma einer Wirtszelle, in das sie durch den

Stich einer Blattlaus gelangen, reproduzieren (Lehrbuch der Botanik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1971, S. 291). Der echte Mehltaupilz benötigt, wie alle obligaten Parasiten, für seine Entwicklung vorrangig solche Epidermiszellen, die das Streckungsstadium noch nicht durchlaufen haben (Temmen, K.-H. 1983: Resistenz von Pflanzen gegenüber echten Mehltaupilzen II. Zusammenhang zwischen Vakuolisierung der Epidermiszellen und Resistenzniveau am Modell *Ribes nigrum*-*Spaerotheca mors-uvae*). Erstmals wurde an *Ribes* (Johannisbeere) festgestellt, daß in unterschiedlichen Sorten mit zunehmender Seneszenz bzw. Vakuolisierung der Epidermiszellen der Befall durch den echten Mehltau proportional abnimmt. Für die Ausbildung eines Primärhaustoriums ist eine "Starterzelle" erforderlich, das sind Zellen reich an Cytoplasma. Nach erfolgter Primärinfektion ist das Wachstum des Pilzes bis zur Sporulation außer von einer "Starterzelle" von einem niedrigen Vakuolisierungsgrad der übrigen Zellen abhängig. Sind diese Voraussetzungen nicht gegeben, so muß die Kolonie aufgrund eines reduzierten Angebotes an Stoffwechselprodukten über das Cytoplasma früh oder später sterben. Da alle Pflanzenzellen das Stadium des Streckungswachstums durchlaufen, sind somit auch alle obligaten Schadorganismen von diesem Resistenzmechanismus betroffen. Zellstreckungshormone bewirken eine horizontale oder auch rassenspezifische Resistenz, bei der eine Etablierung des Schädling noch zugelassen wird, ohne den Wirt zu töten. Diese Art der Resistenz ist stabil und dauerhaft, da die Bildung von Pathotypen keine Auswirkung hat. Im Gegensatz dazu ist bei einer vollständigen oder auch rassenspezifischen Resistenz eine Entwicklung des Pilzes meistens nur bis zur Ausbildung von Appressorien, ähnlich wie bei einer apathogenen Wirt-Parasit-Beziehung, möglich (Papillenbildung). Diese Art der Resistenz ist unabhängig vom Vakuolisierungsgrad der Zellen und kann durch andere Mechanismen wie Veränderung in der Genexpression, der Enzymaktivität, der Zellwandmodifikation u. a. begründet sein.

B. Biologische Beispiele

Die Bedeutung der Vakuolisierung der Zellen für die Resistenz von Pflanzen wird durch einen Düngungsversuch am Modell Gerste und dem echten Mehltau (*Erysiphe graminis*) untermauert. Hierfür wurden Versuchspflanzen der Sorte Carina im Gewächshaus in Töpfen (10 Pflanzen/Topf) angezogen und nach Erreichen des 4. Blattes jeweils 1 Variante mit Wasser (Mangelvariante) 1 Variante mit Stickstoff (140 mM Ammoniumnitrat) und 1 mit Phosphat (200 mM Kaliumhydrogenphosphat) behandelt. Zur besseren Verteilung des Düngers auf den Pflanzen wurde 0,05% TWEEN 20 zugegeben. 5 Tage später erfolgte die Mehltauinokulation. Eine Sorte mit hoher Feldresistenz wurde ausgewählt, da durch deren niedrigeren Anfangsbefall die Auswirkungen der Dünger besser zum Tragen kommen. Die einseitige N-Düngung hemmte das Längenwachstum der Pflanzen und förderte die Entwicklung von Mehltaupusteln auf den Blättern, wogegen die Phosphat-Variante das Gegenteil bewirkte und eine 50%ige Befallsreduktion zur Folge hatte. Mit Hilfe von histologischen Untersuchungen in Form von Paraffinschnitten konnte nach 24 Stunden p.i. in der Stickstoff-Variante parallel mit einem verstärkten Pilzwachstum eine geringere Vakuolisierung besonders der Stomata- und Kurzzellen beobachtet werden, wogegen in der Phosphat-Variante eine Korrelation zwischen starker Vakuolisierung und geringer Anzahl Primärhaustorien zu verzeichnen war. Nach Etablierung der Primärhaustorien war der Pilz aufgrund der fingerförmigen Haustorien in beiden Varianten in der Lage, Sekundärhaustorien auch in Zellen mit hohem Vakuolisie-

rungsgrad zu entwickeln.

In einem Modellversuch wurde die resistenzinduzierende Eigenschaft von 2 repräsentativen Zellstreckungshormonen untersucht, wobei sowohl die Idolylessigsäure (IES) 10^{-6} M als auch Tryptophan (TRY) 10^{-3} M gegenüber dem echten Mehltau (*Sphaerotheca fuliginea*) auf der Gurkensorte Vorgebirgstraube resistenzinduzierende Eigenschaften aufwiesen. Die befallsreduzierende Wirkung lag zwischen 40% bei IES-Applikation und 60% bei Tryptophan-Applikation im Vergleich zur Kontrolle. Die Pflanzen wurden im 5-Blattstadium jeweils mit 50 ml/Topf und Pflanze behandelt und nach 3 Tagen mit Mehltau inokuliert. Eine Wasserbehandlung diente als Kontrolle. Mit Hilfe der Abdruckmethode (K.-H. Temmen, W. Gruppe und E. Schlösser 1982: Investigation of the resistance of plants to powdery mildew. IV Basis for horizontal resistance of cucumber cv against *Sphaerotheca fuliginea*. Proceedings of the Eucarpia Meeting: Breeding of cucumber and melons (19.-22.8. in Wageningen, 16-22.) wurde 144 Stunden nach der Inokulation festgestellt, daß die Anzahl der Mehltaukolonien in den behandelten Varianten im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert und die Sporulation beeinträchtigt waren. Mit Hilfe von Paraffinschnitten konnte beobachtet werden, daß parallel mit dem steigenden Vakuolisierungsgrad der Epidermiszellen die Bildung von Haustorien proportional abnahm. Die Primärinfektion erfolgte vorrangig in den noch nicht vakuolisierten plasmareichen Zellen. So konnte in der Tryptophan-Variante nach 24 Stunden p.i. von jeweils 100 Infektionsversuchen des Pilzes 22 Primärhaustorien in nicht vakuolisierten und 11 in teilweise vakuolisierten Zellen festgestellt werden. Im Vergleich dazu lag die Anzahl in der IES-Variante mit 33 in plasmareichen und 15 in teilweise vakuolisierten Zellen, proportional zum Infektionsverlauf, etwas höher. Die Anzahl Sekundärhaustorien war nach 144 Stunden p.i. in der Tryptophan- sowie in der IES-Variante im Vergleich zur Kontrolle mit ca. 60% stark reduziert, wobei der Unterschied innerhalb der beiden Varianten gering war.

Patentansprüche

1. Pflanzenstärkungsmittel, gekennzeichnet durch eine wirksame Menge eines Zellstreckungshormones.
2. Mittel gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellstreckungshormon zu der Gruppe der Auxine oder verwandten Wirkstoffen sowie zu den Naphthalin-Verbindungen, den substituierten Phenolverbindungen oder Benzoesäuren gehört.
3. Mittel gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellstreckungshormone Idolylessigsäure und Tryptophan in Modellversuchen die Zellstreckung und damit die Vakuolisierung der Zellen beschleunigen.
4. Mittel gemäß Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine resistenzinduzierende Wirkung darauf beruht, daß den biotrophen Pilzen aufgrund der Vakuolierung der Zellen die Versorgungsgrundlage entzogen wird.
5. Mittel gemäß Anspruch 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß alle Pflanzenzellen nach Applikation von Zellstreckungshormonen von einer Beschleunigung ihrer Vakuolisierung betroffen sind.
6. Mittel gemäß Anspruch 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß die mit Zellstreckungshormonen behandelten Zellen ihr Volumen stark vergrößern, den Gehalt an Cytoplasma proportional zum Zellwachstum jedoch stark vermindern.
7. Mittel gemäß Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß durch Zellstreckungshormone die Anzahl

der "Starterzellen", welche für die Primärhaustorien von obligaten Parasiten notwendig sind, sowie ebenfalls solche, in denen sich die Sekundärhaustorien bilden, reduziert werden.

8. Verfahren zur Bekämpfung von biotrophen Parasiten, dadurch gekennzeichnet, daß man auf die Pflanzen ein Zellstreckungshormon auf der Basis von Auxinen oder verwandten Stoffen, wie sie gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 definiert sind, appliziert.